溫度對花椰菜花球發育調控的影響

林楨祐[1]、陳宣蘋[1]、李香誼[1]、夏奇鈮[2]

[1]農業部農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所蔬菜系

[2]農業部農業試驗所遺傳資源及生物技術組

摘要

低溫環境下花椰菜的開花抑制基因 *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*)在花球發育前轉錄量下降，春化作用抑制 *FLC* 的表達。在 15°C 處理中，*BoFLC1* 與 *BoFLC2* 在花球發育前期與開花的前期，分別呈現轉錄量下降的趨勢，當 *BoFLC1* 與 *BoFLC2* 轉錄量第一次下降時，開始形成小花球並進入花球發育的階段，當 *BoFLC1* 與 *BoFLC2* 轉錄量第二次下降時，花苞形成與開花，花椰菜的 *BoFLC1* 與 *BoFLC2* 表達呈現 W 字型的模式。在自然環境的網室設施內，'Bo-903'在日平均溫度 27.8°C (31.3°C / 23.2°C)時可見到小花球的形成，'Bo-903'的 *BoFLC1* 於第 42-56 天被抑制時朝向花球發育的階段，花球發育期時'Bo-903'的 *BoFLC1* 轉錄量維持在低量，促使花球緩慢形成，*BoFLC2* 雖於在營養生長期的轉錄量逐漸減低，但在花球發育期因高溫導致轉錄量提高，顯示高溫環境下 *BoFLC2* 並非為主要調控花球形成者。在自然環境的網室內，'Bo-905'於日平均溫度 25.1°C (28.8°C / 20.7°C)時可見到小花球的形成，且 *BoFLC1* 與 *BoFLC2* 在花球發育前轉錄量皆下降，二個開花抑制基因對花球的發育彼此間呈現協同調控的機制。

關鍵詞：花椰菜、花球發育、開花抑制基因、溫度

緒言

花椰菜喜歡冷涼的環境，屬綠植株春化型作物，一般需經由春化作用來誘導花球的形成與發育，高溫環境會延遲莖頂分生組織發育成花球的時間 (Lin *et al*., 2019b)。當低溫春化時活化了春化基因 *VERNALIZATION 2* (*VRN2*)的開花途徑並傳達調控訊息，經由 *VRN2* 調降開花抑制基因 *FLOWERING LOCUS C*（*FLC*）的 mRNA 量使植物朝向開花的途徑發展（Sheldon *et al*., 2006），許多蕓苔屬作物有低溫春化的需求才能誘導開花，春化過後的花椰菜在適當的環境條件下會表現出正常的花球發育（Labate *et al*., 2006），但若在花球創始後再遭遇高溫，則會影響莖頂分生組織發育成花球的時間(Lin *et al*., 2023)。過去的發表多關注低溫條件下 *FLC* 的調節表現與誘導開花的反應，卻少有非春化溫度下 *FLC* 的表達及花球發育的資訊，由於熱帶地區的花椰菜在高溫的條件下，仍然有結球的表現，因此在非春化溫度下 *FLC* 的表達值得探究。除了經由低溫春化途徑調控外，在阿拉伯

芥中也發現經由自發途徑中來調控 *FLC* 的表達，然後朝向開花（Marquardt *et al.*, 2006）。Gan 等(2014)指出阿拉伯芥在高溫下修飾 *FLC* 的熱敏感性，其調控機制是經由延長生理節奏以提供對溫度的補償（Edwards *et al.*, 2006）。蕓苔屬作物具有不同的開花抑制基因 *BoFLCs*，花椰菜中的 *BoFLC1* (Sun *et al.*, 2018) 與 *BoFLC2* (Matschegewski *et al.*, 2015）在高溫與低溫環境下呈現不同的表達，以及出現不同的結球反應過程。本研究藉由花椰菜結球觀察以及開花抑制基因 *BoFLC1* 和 *BoFLC2* 的表達情形，探討溫度對花椰菜花球發育的影響。

材料與方法

生長箱低溫處理

以花椰菜‘Bo-903’與‘Bo-905’等二個雙單倍體系作為試驗材料，‘Bo-903’屬於中生品系，‘Bo-905’ 屬於中晚生品系，二個雙單倍體系以小孢子培養育成，於 3 月 18 日播種，當苗齡為 28 天時，於 4 月 15 日將幼苗種植於口徑 10 cm 的塑膠盆中並移到生長箱內，在 16 小時光期與 8 小時暗期的光週期下，分別處理 10°C、15°C 與 20°C 溫度，調查溫度處理後 112 天間的花椰菜的生長型態。每週進行結球、抽苔、開花與結莢等觀察與紀錄，每二週進行葉片取樣，取樣部位為接近植株莖頂組織的未成熟葉片，用以檢測二種開花抑制基因 *BoFLC1 與 BoFLC2* 的表達，基因表達的相對轉錄量以該檢測基因在溫度處理後第 14 天的轉錄量為對照相對量。

自然環境

以花椰菜‘Bo-903’與‘Bo-905’二個雙單倍體系作為試驗材料，‘Bo-903’屬於中生品系，‘Bo-905’ 屬於中晚生品系，於 7 月 8 日播種，當苗齡為 28 天時將幼苗移植至口徑 30 cm 的塑膠盆中栽培，並於 8 月 5 日放置在塑膠布網室內生長，調查移植後 182 天間花椰菜的生長型態，至隔年越冬後的 2 月 3 日停止調查。每週進行結球、抽苔與開花等觀測與調查，每二週進行葉片取樣，取樣部位為接近莖頂組織的未成熟葉片，用以檢測二種開花抑制基因 *BoFLC1 與 BoFLC2* 的表達，基因表達的相對轉錄量以該檢測基因在移植後第 14 天的轉錄量為對照相對量。以溫溼度紀錄器 HOBO pro v2 data logger 紀錄塑膠布網室內氣溫。利用 SAS-EG (SAS Enterprise Guide 7.1 系統) 分析數據。

BoFLC1 引子設計:

forward 5’-CATGAGCTACTGGAACTTGTGGAA-3’ reverse 5’-GAACCCACACTTACATTATCGACATT-3’

BoFLC2 採用 Ridge 等(2015)所發表的引子:

forward 5’-CGAAGTATGGTTCACACCATGAGC-3’ reverse 5’-CGGAGAGGGCAGTCTCAAGGTGGTT-3’

結果

花球發育表現

在 10°C 處理中，‘Bo-903’在第 54 天時肉眼可見小花球，第 68 天時完成花球發育，‘Bo-905’在第 56 天時可見小花球，在第 73 天時完成花球發育。在 15°C 處理中，‘Bo-903’與 Bo-905’分別在第 38 天與第 42 天可見到小花球形成，二品系皆在第 56 天完成花球發育，並進入抽苔與開花的階段，‘Bo-903’與‘Bo-905’分別在第 80 天與第 84 天開始開花 (圖 1)。至第 112 天時，在 20°C 的環境下則尚無肉眼可視的小花球形成。10°C 處理的二個品系在第 112 天時仍處於花球鬆散的抽苔階段。在自然環境的設施網室中，‘Bo-903’在第 98 天時(11 月 11 日)肉眼可以見到小花球，於第 130 天時(12 月 13 日)花球發育完成，於第 154 天(1 月 6 日)開始開花。‘Bo-905’在第 126 天時(12 月 9 日)可見小花球，於第 140 天時(12 月 23 日)花球發育完成，於第 168 天(1 月 20 日)開始開花 (圖 3)。

開花抑制基因表達

15°C 處理中，‘Bo-903’的 *BoFLC1 與 BoFLC2* 的轉錄量呈現兩次下降的情形，*BoFLC1* 表現量於第 28 天時開始下降，至 56 天時為低點，此為生育期中之第一次基因表現量下降，而第二次基因表現量下降則於第 70 天開始，至 84 天時為低點 (圖 2A)。*BoFLC2* 表現量於第 28 天時開始下降，至 42 天時為低點，此為 *BoFLC2* 的第一次表現量下降，而第二次基因表現量下降則從第 70 天開始，至 84 天時為低點 (圖 2B)。‘Bo-905’的 *BoFLC1 與 BoFLC2* 的轉錄量亦呈現兩次下降的情形，*BoFLC1 與 BoFLC2* 皆於第 14 天時開始下降，至 42 天時為低點 (圖 2C)，此為第一次基因表現量下降，且此兩個開花抑制基因的表現量出現第二次下降皆從第 56 天開始，至 84 天時為低點 (圖 2D)。

在設施網室的自然環境下，對應結球之前，呈現‘Bo-903’的 *BoFLC1* 轉錄量下降時段從第 42 天時開始下降，至 56 天時為低點，之後在第 70 至 140 天間維持低量表達 (圖 4A)，*BoFLC2* 轉錄量從第 112 天時開始下降，至 126 天時為低點，高溫下的日平均溫度 27.8°C 時 (圖 5)， *BoFLC2* 轉錄量第 98 至 112 天間呈現出高量表達 (圖 4B)。在‘Bo-905’結球前的 *BoFLC1* 表現量於第 126 天時開始下降，至 140 天時為低點 (圖 4C)，*BoFLC2* 於第 112 天時開始下降，至 126 天時為低點 (圖 4D)。對應開花表現前，‘Bo-903’的 *BoFLC1* 表現量於第 126 天時開始下降，至 140 天時為低點 (圖 4A)，*BoFLC2* 於第 140 天時開始下降，至 154 天時為低點(圖 4B)。開花前‘Bo-905’的表現量於第 168 天時開始下降，至 182 天時為低點(圖 4C)，*BoFLC2* 於第 140 天時開始下降，至 168 天時為低點(圖 4D)。

討論

春化溫度調控

二個品系在 10°C 環境下其營養生長所需的時間明顯長於在 15°C 環境，但 10°C 可略縮短花球發育階段的時間，之後進入花球鬆散與抽苔的過程時，過低溫的 10°C 的環境會使花球鬆散與抽苔時間延長，導致開花的時間被延後。15°C 環境可使二個品系順利進入開花的階段，顯示提供適當的低溫春化溫度可改善營養生長期與抽苔期時間被延長的現象。二個品系在 20°C 的環境下持續生長 112 天仍無可視的花球形成，推論 20°C 可能為此二品系花球形成的非春化溫度障礙。在 15°C的二品系從花球發育到開花的過程中，轉錄量呈現兩次被抑制的表現，第一次轉錄量下降後呈現花球發育的狀態，第二次轉錄量下降後表現出開花現象。Lin 等(2019b) 指出花椰菜在 18°C的條件下，早生種與中晚生種在播種後 31 天與 52 天，其葉片數分別為 5.4 片與 6.6 片葉時，*BoFLC2* 轉錄量下降，由莖頂分生組織切片可見花椰菜進入花球創始的階段。在 10°C 的環境下，雖然'Bo-903'與'Bo-905'的 *BoFLC1* 皆在第 42-56 天被抑制，但由於'Bo-903'的 *BoFLC2* 被抑制的時間明顯較早，因此'Bo-903'較'Bo-905'更提早進入花球發育的階段。Ridge 等(2015)指出，低溫春化誘導開花的主要調控者為 *BoFLC2*，是甘藍在低溫條件下控制開花時間最重要的開花抑制基因，亦即在低溫狀態下 *BoFLC2* 的影響力大於 *BoFLC1*。第二次轉錄量下降表現在花球鬆散至抽苔階段，當 *BoFLC1* 與 *BoFLC2* 轉錄量被抑制時，促使花椰菜進入開花的階段，之後於結莢時轉錄量再次增加。因此，開花抑制基因不僅僅是調控開花時間，對於花椰菜作物也會調控結球時間。在花椰菜的開花抑制基因的轉錄量低點分別出現在花芽未分化完成的結球階段，以及分化完成後的開花階段，轉錄量的表達呈現 W 字型的模式。

非春化溫度調控

在自然環境的設施內'Bo-903'在第 98 天可見到小花球開始形成，此時的日平均溫度約 27.8°C (晝夜平均溫度 31.3°C/23.2°C)，屬於非低溫條件，因此，開花調控機制應非如 Okazaki 等(2007)所指在春化作用下是由 *BoFLC2* 來擔任主要的開花控制者。Matschegewski 等（2015）指出過去多數研究多集中在低溫春化誘導開花，以及低溫時開花抑制基因對開花時間的調控，然而溫帶花椰菜在高溫下，*BoFLC2* 對花球誘導亦具有影響性。Lin 等(2019a) 指出 *BoFLC1* 可在 27°C 調控耐熱型青花菜的花球形成，即開花抑制基因並非完全藉由低溫春化來調控。'Bo-903'的 *BoFLC1* 於第 42-56 天開始被抑制而趨向結球方向，但由於高溫影響使得 *BoFLC1* 轉錄量略為提高，但仍一直維持在低量的表現(第 70-140 天)，也因此促使'Bo-903'緩慢的形成花球。此結果與 Sun 等(2018) 闡述高溫延遲花椰菜花球的發育，但並未延遲 *BoFLC1* 在花椰菜中順向調控的論點相似。Lin 等(2023)揭示兩個早生型花椰菜在花球創始後遇到 30°C 高溫，*BoFLC1* 呈現順向和逆向的兩種不同的結球調控結果，順向調控者莖頂分生組織繼續發育成花球，逆向調控者的莖頂分生組織則發育變緩。'Bo-903'的 *BoFLC2* 雖於第 42-70 天被抑制，但因

高溫使轉錄量於第 84-112 天提升，明顯抑制花球的發育，直至第 112-126 天轉錄量下降，開花抑制基因被抑制表達後促使花球繼續發育成熟，顯示高溫下‘Bo-903’的 *BoFLC1* 為形成花球的調控者，*BoFLC2* 為輔助花球發育的調控者。

花椰菜‘Bo-905’於的結球並非只有單一一個 *BoFLC* 調控，‘Bo-905’在非春化溫度的日平均溫度 25.1°C (晝夜平均溫度 28.8°C/20.7°C)時形成花球與發育，*BoFLC1* 在第 126-140 天轉錄量急速降低，*BoFLC2* 在第 98-126 天轉錄量緩慢降低，呈現兩種不同的抑制表達模式，顯示在非低溫環境下，*BoFLC1* 與 *BoFLC2* 彼此間的協同調控。Edwards 等（2006）和 Gan 等（2014）證明阿拉伯芥中的開花抑制基因即使沒有給予低溫春化條件，仍可在高溫的條件下調控開花。控制開花抑制基因表達的自發途徑與春化途徑是可並行發展（Reeves and Couplant, 2000）。在高溫條件下，花椰菜的結球機制可能是經由自發途徑來調控 *BoFLCs* 表達，調控花球形成與花球發育的不同時間點，應可用於解釋花椰菜在高溫結球或花球形成延遲的機制。

引用文獻

1. Edwards, K. D., P. E. Anderson, A. Hall, N. S. Salathia, J. C. W. Locke, J. R. Lynn, M. Straume, J. Q. Smith, and A. J. Millar. 2006. *FLOWERING LOCUS C* mediates natural variation in the high-temperature response of the *Arabidopsis* circadian clock. Plant Cell 18:639-650. doi:10.1105/tpc.105.038315.
2. Gan, E. S., Y. Xu, J. Y. Wong, J. G. Goh, B. Sun, W. Y. Wee, J. Huang, and T. Ito. 2014. Jumonji demethylases moderate precocious flowering at elevated temperature via regulation of *FLC* in *Arabidopsis*. Nat. Commun. 5:5098. doi:10.1038/ncomms6098.
3. Labate, J. A., L. D. Robertson, A. M. Baldo, and T. Björkman. 2006. Inflorescence identity gene alleles are poor predictors of inflorescence type in broccoli and cauliflower. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 131:667-673. doi:10.21273/JASHS.131.5.667.
4. Lin, C. Y., C. H. Hsieh, T. Y. Yeh, and H. I. Lee. 2023. Collaborative Expression of *FLOWERING LOCUS C* in Heat-tolerant Cauliflower. Fruits 78(2):1-7. doi:org/10.17660/th2023/008.
5. Lin, C.W., Fu, S.F., Liu, Y.J., Chen, C.C., Chang, C.H., Yang, Y.W., and Huang, H.J. 2019a. Analysis of ambient temperature-responsive transcriptome in shoot apical meristem of heat-tolerant and heat-sensitive broccoli inbred lines during floral heat formation. BMC Plant Biol. 19:3. doi:10.1186/s12870-018-1613-x.
6. Lin, C. Y., K. S. Chen, H. P. Chen, H. I. Lee, and C. H. Hsieh. 2019b. Curd

Initiation and Transformation in Tropical Cauliflower Cultivars under Different Temperature Treatments. HortScience 54(8):1351-1356. doi:10.21273/HORTSCI13881-19.

7. Marquardt, S., P. K. Boss, J. Hadfield, and C. Dean. 2006. Additional targets of the *Arabidopsis* autonomous pathway members, *FCA* and *FY*. J. Exp. Bot. 57(13):3379-3386. doi: 10.1093/jxb/erl073.
8. Matschegewski, C., H. Zetzsche, Y. Hasan, L. Leibeguth, W. Briggs, F. Ordon, and R. Uptmoor. 2015. Genetic variation of temperature regulated curd induction in cauliflower: elucidation of floral transition by genome-wide association mapping and gene expression analysis. Front. Plant Sci. 6:720. doi:10.3389/fpls.2015.00720.
9. Okazaki, K., Sakamoto, K., Kikuchi, R., Saito, A., Togashi, E., Kuginuki, Y., Matsumoto, S., and Hirai, M. 2007. Mapping and characterization of *FLC* in *Brassica oleracea*. Theor. Appl. Genet. 114, 595–608. doi:10.1007/s00122-006-0460-6.
10. Reeves, P. H., and G. Coupland. 2000. Response of plant development to environment: control of flowering by daylength and temperature. Curr. Opin. Plant Biol. 3:37-42. doi:10.1016/S1369-5266(99)00041-2.
11. Ridge, S., P. H. Brown, V. Hecht, R. G. Driessen, and J. L. Weller. 2015. The role of *BoFLC2* in cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.) reproductive development. J. Exp. Bot. 66:125-135. doi:10.1093/jxb/eru408.
12. Sheldon, C. C., E. J. Finnegan, E. S. Dennis, and W. J. Peacock. 2006. Quantitative effects of vernalization on *FLC* and *SOC1* expression. Plant J. 45: 871-883. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02652.x.
13. Sun, X., J. Bucher, Y. Ji, A.D.J. van Dijk, R.G.H. Immink, and G. Bonnema. 2018. Effect of ambient temperature fluctuation on the timing of the transition to the generative stage in cauliflower. Environ. Exp. Bot. 155:742-750. doi:10.1016/j.envexpbot.2018.06.013.

Effect of Temperature on Regulation of Curd Development in Cauliflower

Chen-Yu Lin[1], Hsuan-Ping Chen[1], Hsiang-I Lee[1], and Chi-Ni Hsia[2]

[1]Department of Vegetable Crops, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Ministry of Agriculture.

[2]Crop Genetic Resources and Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Ministry of Agriculture.

ABSTRACT

At low temperature, the transcript levels of *FLOWERING LOCUS C* were decreased in cauliflower ‘Bo-903’ and ‘Bo-905’ before curd development. Vernalization inhibited the expression of *FLOWERING LOCUS C*. At 15°C treatment, the transcript levels of *BoFLC1* and *BoFLC2* were decreased before curd development period and before flowering period, respectively. The curd formation and curd development when *BoFLC* transcript levels decreased for the first time. Cauliflower flowering when *BoFLC* transcript levels decreased for the second time. Bolting as well as pod formation respectively when transcript levels were increased. The transcript level of *FLC* in cauliflower showed a W-shaped pattern. At average daily temperature of 27.8°C (average 31.3°C/23.2°C),'Bo-903' began to form curd in natural environment of net greenhouse. The *BoFLC*1 of Bo-903'was inhibited during the 42-56 days then down-regulated curd development. During the curd development period, *BoFLC1* transcription amount of Bo-903' was maintained at a low level which would slowly promote form curds. The *BoFLC2* was gradually inhibited in the vegetative growth period, however, transcript level was increased during curd development period. The results implicated that *BoFLC2* was not the main regulator of curd formation in high-temperature environments. At average daily temperature of 25.1°C (average 28.8°C/20.7°C), 'Bo-905' began to form curd and develop in natural environment of net greenhouse. The results revealed that collaborative regulation mechanism of *BoFLC1* and *BoFLC2*.

Key words: Cauliflower, Curd development, *FLOWERING LOCUS C*, Temperature

圖 1. 花椰菜在不同溫度下的花球發育與開花情形。

Fig.1. Curd development and flowering of cauliflower at different temperature.

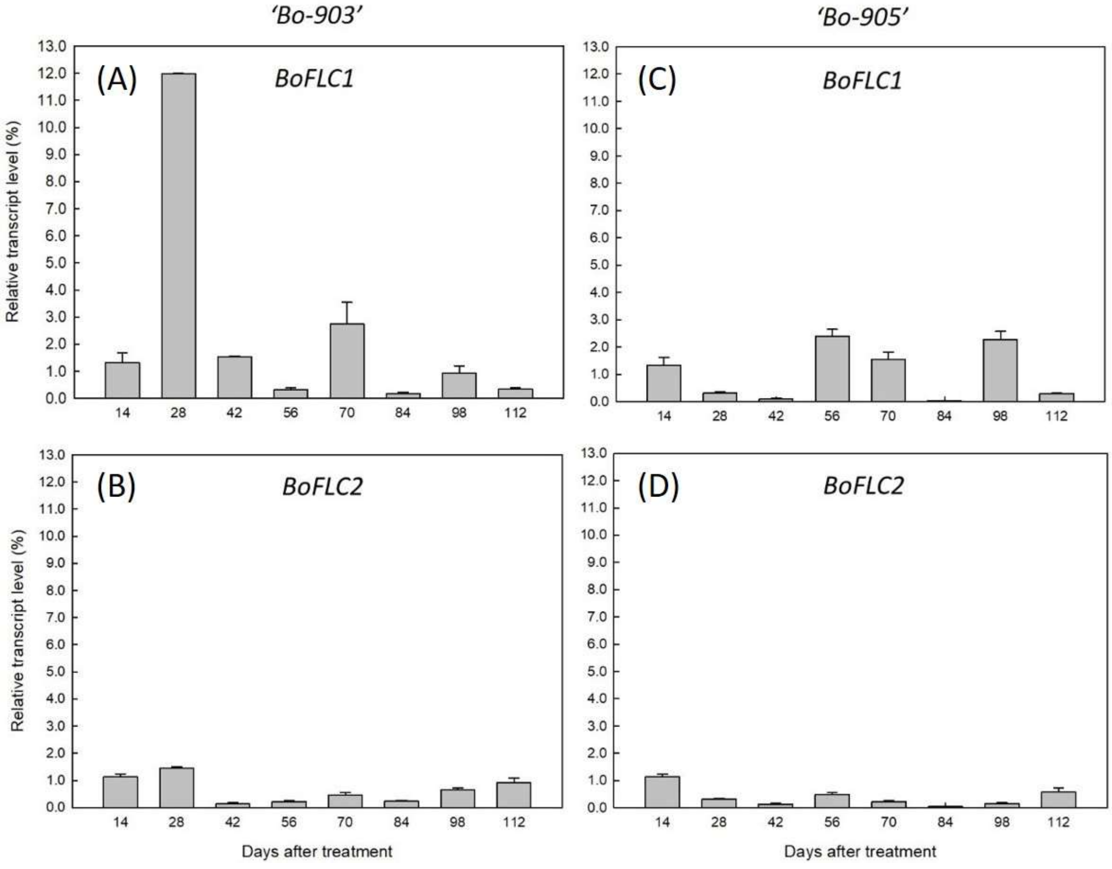

圖 2. 花椰菜在 15°C的開花抑制基因的表達。

Fig.2. The *FLOWERING LOCUS C* expression of cauliflower at temperature 15°C.

圖 3. 花椰菜在網室內的花球發育與開花情形。

Fig.3. Curd development and flowering of cauliflower in plastic net house.

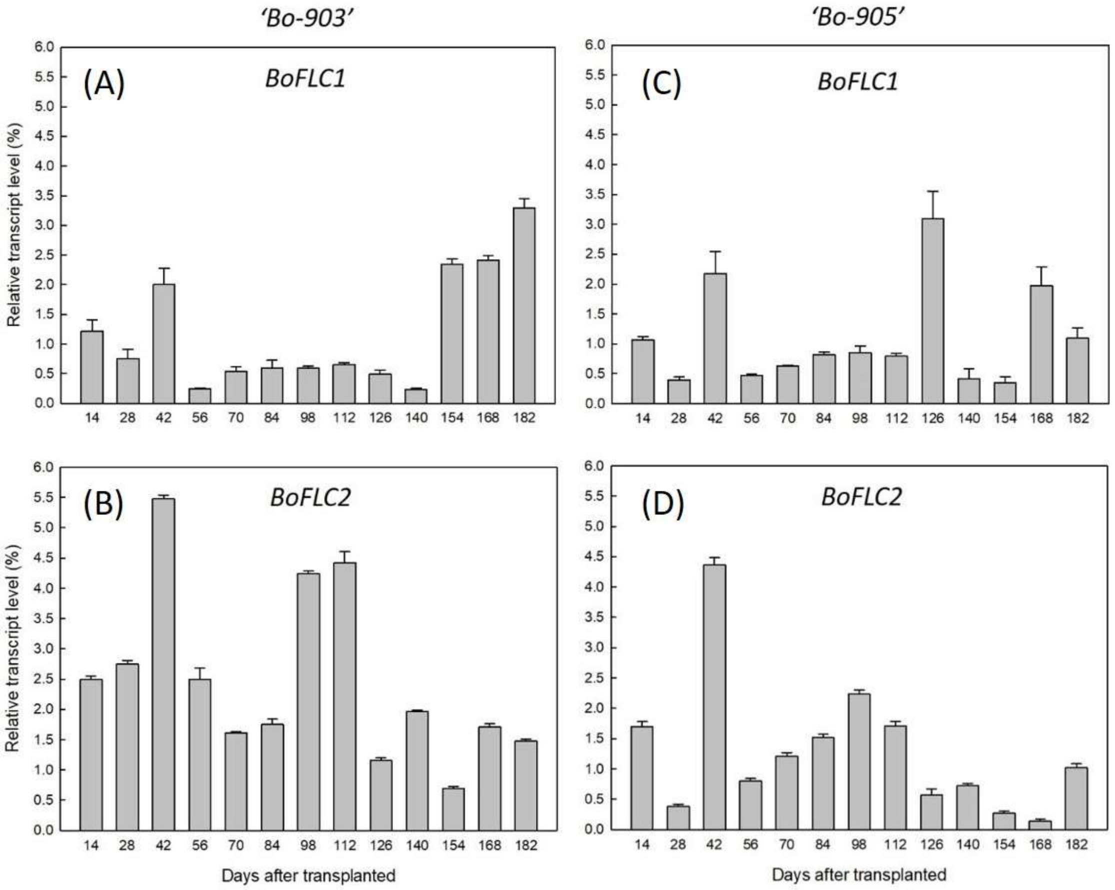

圖 4. 花椰菜在網室內的開花抑制基因的表達。

Fig.4. The *FLOWERING LOCUS C* expression of cauliflower in plastic net house.

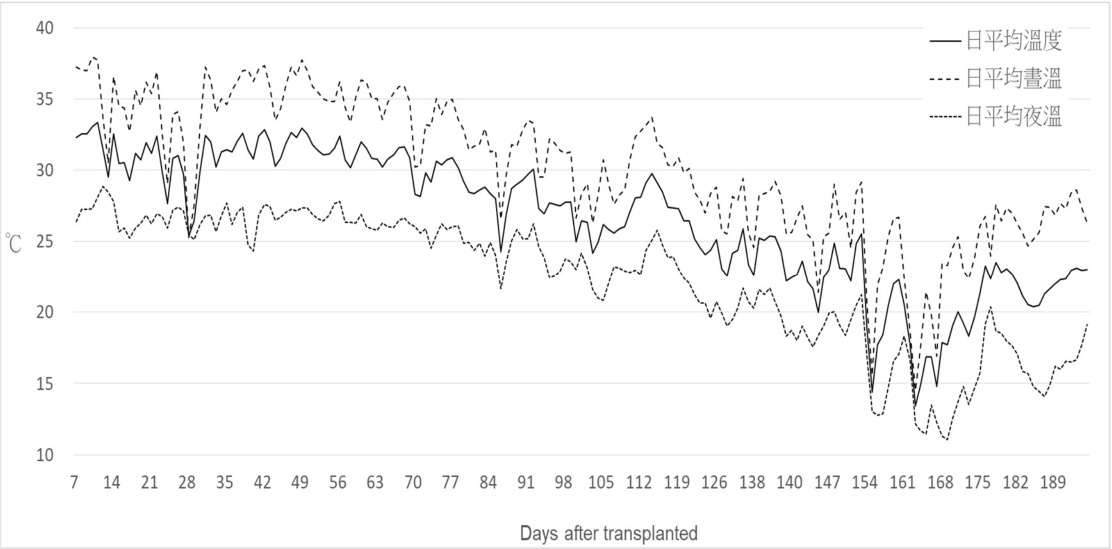

圖 5. 網室內的日平均溫度、日平均晝溫、日平均夜溫。

Fig.5. The daily average temperature, average day temperature, and average night temperature in plastic net house.